

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年10月23日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/087290 A1

- (51) 国際特許分類: C12G 1/022, C12N 9/24
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04770
- (22) 国際出願日: 2003年4月15日 (15.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-113592 2002年4月16日 (16.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 天野エンザイム株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒460-0003 愛知県 名古屋市 中区錦一丁目2番7号 Aichi (JP). 独立行政法人酒類総合研究所 (NATIONAL RESEARCH INSTITUTE OF BREWING) [JP/JP]; 〒739-0046 広島県 東広島市 鏡山三丁目7番1号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鶴喰 寿孝 (TSURUHAMI, Kazutaka) [JP/JP]; 〒509-0108 岐阜県 各務原市 須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). 天野 仁 (AMANO, Hitoshi) [JP/JP]; 〒509-0108 岐阜県 各務原市 須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). 森 茂治 (MORI, Shigeharu) [JP/JP]; 〒509-0108 岐阜県 各務原市 須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内 Gifu (JP). 後藤 奈美 (GOTO, Nami) [JP/JP]; 〒739-0046 広島県 東広島市 鏡山三丁目7番1号 独立行政法人酒類総合研究所内 Hiroshima (JP). 荒 巻 功 (ARAMAKI, Isao) [JP/JP]; 〒739-0046 広島県 東広島市 鏡山三丁目7番1号 独立行政法人酒類総合研究所内 Hiroshima (JP). 藤田 晃子 (FUJITA, Akiko) [JP/JP]; 〒739-0046 広島県 東広島市 鏡山三丁目7番1号 独立行政法人酒類総合研究所内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 小西 富雅, 外 (KONISHI, Tomimasa et al.); 〒460-0002 愛知県 名古屋市 中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エステートビル7階 Aichi (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITIONS FOR IMPROVING THE FLAVOR OF ALCOHOLIC BEVERAGE MADE FROM GRAPE

(54) 発明の名称: 葡萄を原料とする酒の風味改善用組成物

(57) Abstract: It is intended to provide novel compositions usable in improving the flavor of an alcoholic beverage made from grape typified by wine. Namely, a composition usable in improving the flavor of an alcoholic beverage made from grape which contains the culture of a strain belonging to a genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Talaromyces*, *Mortierella*, *Cryptococcus*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* or *Actinoplanes* and being capable of producing diglycosidase.

(57) 要約: ワインに代表される葡萄を原料とする酒の風味改善に利用できる、新規な組成物を提供する。アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、タラロマイセス (*Talaromyces*) 属、モルチエレラ (*Mortierella*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、マイクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、又はアクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属に属し、ジグリコシダーゼを生産可能な菌株の培養物を含む、葡萄を原料とする酒の風味改善用組成物。

WO 03/087290 A1

## 明 細 書

## 葡萄を原料とする酒の風味改善用組成物

## 5 技術分野

本発明は葡萄を原料とする酒の風味の改善に利用される組成物に関する。また、当該組成物を用いた葡萄を原料とする酒の製造方法、及び葡萄を原料とする酒に関する。本発明を適用することにより、風味の改善された葡萄を原料とする酒、例えば優れたフレーバーのワインを提供することができる。

10

## 背景技術

原産地の違いや、製造方法の違い等によってそれぞれ特有のフレーバーを有する多種多様なワインが流通している。ワインの風味（フレーバー）は、もとより原料となる葡萄の品質に大きく左右される。

15 一方、含まれる香気成分の量を増加し、香気豊かな、即ち風味の改善されたワインを提供する試みが行われている。ワインの風味を改善する方法の一つとして、ワインの製造工程において $\beta$ -グルコシダーゼを添加し、その酵素作用によって香気を増強する方法が知られている。

尚、マスカット系品種及びリースリング、ケルナーなどのドイツ系品種のワイン  
20 の特徴的な香気成分であるモノテルペン類は、ブドウ中では大部分が二糖類の配糖体（ $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside、 $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside、apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside）として存在している。

$\beta$ -グルコシダーゼはグルコース耐性が低いという性質を有する。従って、ワ  
25 インの製造過程において原料中のグルコース濃度が高い発酵工程前に使用するこ

とはできず、発酵が進み、原料ワイン中のグルコース濃度が低くなった段階で添加して作用させる必要がある。そこで、 $\beta$ -グルコシダーゼを利用する場合には、一般に当該酵素を発酵終了後の原料ワインに添加し（例えば racking 工程（上清を移し替える工程）で添加し）、作用させていた。即ち、 $\beta$ -グルコシダーゼを使用した方法では、酵素反応を行う時期の制約が大きく使い勝手が悪いものであった。

一方、消費者の嗜好性の多様化が進み、従来とは異なる風味のワインに対するニーズが高まっている。このようなニーズに鑑みて、従来とは異なる機構に基づいて香気成分の増強を行うワインの製造方法の開発が望まれていた。

本発明は以上の課題に鑑みなされたものであり、その目的とするところはワインに代表される葡萄を原料とする酒の風味改善に利用できる、新規な組成物を提供することである。また、風味の改善がなされた葡萄を原料とする酒の製造方法、及び風味の改善がされた葡萄を原料とする酒を提供することである。また、製造工程の煩雑化を伴うことなくこのような葡萄を原料とする酒の製造方法、及び葡萄を原料とする酒を提供することを他の目的とする。

#### 発明の開示

以上の目的の下、本発明者らは葡萄を原料とする酒の代表であるワインをモデルとして、その風味の改善を試みた。即ち、まずジグリコシダーゼの作用に注目し、ジグリコシダーゼを産生する微生物の培養物を風味改善用の組成物として用いることに想到した。そして、ワインの発酵工程において当該組成物を添加し、作用させたところ、原料中の香気成分を効率的に引き出すことができ、極めて優れたフレーバーのワインを製造できた。このことから、当該ジグリコシダーゼを含む組成物がワインなどの葡萄を原料とする酒の風味改善に有用であるとの知見

が得られた。また、当該組成物は従来の $\beta$ -グルコシダーゼを作用させることができなかつた発酵工程においても作用させることができるものであり、 $\beta$ -グルコシダーゼとは異なる機構により風味が改善されていることは勿論のこと、発酵工程後の酵母の除去と同時に当該組成物の除去を行うこともできるなど製造工程上有利なものであるとの知見が得られた。

本発明はかかる知見に基づくものであり、その構成は次の通りである。

[1] アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、タラロマイセス (*Talaromyces*) 属、モルチエレラ (*Mortierella*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、又はアクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属に属し、かつジグリコシダーゼを生産可能な菌株の培養物を含む、葡萄を原料とする酒の風味改善用組成物。

[2] 前記菌株が、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、又はペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) に属する、[1]に記載の風味改善用組成物。

[3] 前記菌株が、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IFO4407、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IAM2020、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) IAM2046、又はペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) IAM7153である、[1]に記載の風味改善用組成物。

[4] ペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) IAM7153が生産する菌体外酵素を含む風味改善用組成物。

[5] ジグリコシダーゼ活性が、乾燥重量換算で0.0001単位/mg以上である、[1]~

[4]のいずれかに記載の風味改善用組成物。

[6] [1]～[5]のいずれかに記載の風味改善用組成物を作用させる酵素処理工程、を含んでなる、葡萄を原料とする酒の製造方法。

[7] 前記酵素処理工程が、葡萄を原料とする酒の製造工程の一部に前記風味  
5 改善用組成物を添加して行うことからなる、[6]に記載の製造方法。

[8] 前記製造工程の一部が、除梗破碎工程、圧搾工程、発酵工程、オリ引き工程、及び熟成工程の中から選択される一又は二以上の工程である、[7]に記載の製造方法。

[9] 発酵工程及び／又は熟成工程において[1]～[5]のいずれかに記載の風味  
10 改善用組成物を添加する、ことを特徴とする葡萄を原料とする酒の製造方法。

[10] 前記葡萄を原料とする酒がワインである、[6]～[9]のいずれかに記載の葡萄を原料とする酒の製造方法。

[11] [6]～[10]のいずれかに記載の製造方法により製造された、葡萄を原料とする酒。

15

本明細書において、「風味の改善」は風味の増強を含む用語として用いられ、葡萄を原料とする酒に存在する香気成分の量が増え、風味が豊かなものになることをいう。例えば、甘い香りや芳醇な香りが増強された状態になることが含まれる。尚、本明細書における「風味の改善」には、ある特定の香気成分の量が増強される  
20 ことによって間接的に他の香気成分の感じられ方が変化し、以って全体から受ける香気の影響が変化することとも含まれる。

一方、本明細書において「通常の製造工程」といった場合には、本発明における酵素処理工程が含まれない、葡萄を原料とする酒の製造工程を意味する。

25 また、本明細書において特に記載のない場合には、パーセント(%)は%(W

／V)を意味する。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の一つは葡萄を原料とする酒の風味改善用組成物に関する。本発明の風味改善用組成物（以下、単に「組成物」ともいう）はジグリコシダーゼを産生可能な微生物を培養して得られる培養液（菌体を含む）から調製することができる。使用可能な微生物としては、ジグリコシダーゼ活性が認められているアスペルギルス（*Aspergillus*）属、ペニシリウム（*Penicillium*）属、リゾプス（*Rhizopus*）属、リゾムコール（*Rhizomucor*）属、タラロマイセス（*Talaromyces*）属、モルチエレラ（*Mortierella*）属、クリプトコッカス（*Cryptococcus*）属、ミクロバクテリウム（*Microbacterium*）属、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属、アクチノプラネス（*Actinoplanes*）属等を挙げることができる。

より好適な微生物としては、アスペルギルス ニガー（例えばIFO4407株（入手先 財団法人 発酵研究所 大阪市淀川区十三本町2-17-85）、IAM 2020株）、アスペルギルス・フミガタス（例えばIAM2046株）、ペニシリウム・マルチカラー（例えばIAM7153株（入手先 東京大学分子細胞生物学研究所 東京都文京区弥生1-1-1））を挙げることができる。

20

特に好ましい微生物としては、ペニシリウム・マルチカラー（*Penicillium multicolor*）IAM7153株である。ペニシリウム・マルチカラー由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼは食品添加物リストに掲載されている安全性の認められている酵素であり、かかる安全性の高い菌を利用して得られる組成物についても高い安全性が推測されるからである。

25

上述した各種微生物などを用いて本発明の組成物を製造するためには、当該微生物の培養に適合した方法や条件を適宜設定できる。例えば、上述した各種菌株の培養法としては液体培養法、固体培養法の何れも採用できるが、液体培養法が好適である。液体培養は、  
5 例えば、以下のように行うことができる。

培地としては、ジグリコシダーゼを産生する微生物が生育可能な培地であれば、如何なるものでも良い。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチオビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、更に硫酸アンモニウム、炭酸  
10 アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、あるいは、ペプトン、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、更にカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものを用いることができる。

15 更に、ジグリコシダーゼを生産蓄積せしめるために培地に各種の誘導物質を添加することができる。誘導物質としては例えば糖類が使用でき、好ましくはゲントース（例えば、ゲントース#80、日本食品化工株式会社）、ゲンチオビオース、ゲンチオオリゴ糖（例えば、ゲンチオオリゴ糖、和光純薬工業株式会社）、ガラクトマンナン等が利用できる。これらの誘導物質の添加量は目的とするジグリコシダーゼの生産能が増大される量であれ  
20 ば特に限定されないが、好ましくは0.01～10%が添加される。

培地のpHは例えば約3～8、好ましくは約5～6程度に調整し、培養温度は通常約10～50℃、好ましくは約25～30℃程度で、1～15日間、好ましくは4～7日間程度好氣的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーマンターに  
25 よる好氣的深部培養法が利用できる。しかしながら、上述した各種の培養条件などは培養

する対象である微生物や細胞により適宜変更され、本発明の組成物が生産される条件であれば、その条件等は限定されない。

5 以上の方法によって所望時間培養した後の培養液又は菌体より本発明の組成物が得られる。例えば、培養上清をろ過し、続いて適宜濃縮、バッファー置換、無菌ろ過、凍結乾燥などを行い本発明の組成物を調製することができる。本発明の組成物の状態は固体状（粉体状を含む）であっても液体状であってもよい。

また、例えばジグリコシダーゼ活性を指標として、遠心分離、UF濃縮、塩析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーを組み合わせ、常法により処理して、精製を行うこと  
10 ともできる（参考文献 蛋白質・酵素の基礎実験法、堀尾 武一著、南江堂）。

ここで、本発明の組成物にはジグリコシダーゼが含有されている。換言すれば、本発明の組成物はジグリコシダーゼ活性を有する。好ましくは乾燥重量換算で 0.0001 単位/mg 以上のジグリコシダーゼ活性を有する。ジグリコシダーゼ活性の  
15 上限値は特に限定されないが、例えば 20 単位/mg である。

本発明においてジグリコシダーゼとは、糖鎖加水分解酵素に分類される酵素であって、配糖体を構成している糖以外の化合物（以下「アグリコン」という。）と単一あるいは複数の種類の糖類より構成された直鎖および分岐糖鎖とが糖鎖の水酸基を介して結合したいわゆる配糖体を基質とする事ができ、二糖単位で基質を認識して切断しアグリコンを生成する酵素をいう。尚、ここでのジグリコシダーゼ活性は次の方法により求めた値とする。  
20

#### （ジグリコシダーゼ活性測定法）

自動化学分析装置（東芝社製、TBA-30R）を用い、所定量の組成物を含む試料溶液 30  $\mu$ L  
25 をパラニトロフェニル（pNP）プリメベロシドを 2 mM となるように酢酸緩衝液（pH 5.5）



に溶解せしめたもの 200  $\mu\text{L}$  と混合し、40℃、サイクルタイム 22.5 秒で 9.75 分間反応させた後、炭酸ナトリウム 250  $\mu\text{L}$  を加え 412 nm の吸光度を測定する。試料溶液由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を用いて同様に測定する。この条件下で吸光度を 1 上昇させる酵素量を 1 単位 (AU) とする。

- 5      上記 pNP-プリメベロシドは、pNP-グルコシド (メルク社製) とキシロオリゴ糖 (和光純薬社製) を酵素キシロシダーゼ (シグマ社製) を用いて反応させ、pNP-グルコシドにキシロースを  $\beta$ -1,6 結合で 1 残基転移させることにより合成した。

本発明の組成物は、好ましくはジグリコシダーゼに加えて  $\alpha$ -L-ラムノシダーゼを含有する。特に、ラムノシダーゼ活性が乾燥重量換算で 0.0001 単位/mg  
10      以上あることが好ましい。ラムノシダーゼ活性の上限値は特に限定されないが、例えば 30 単位/mg である。 $\alpha$ -L-ラムノシダーゼとは  $\alpha$ -ラムノースを含むポリサッカライドの非還元末端に存在する  $\alpha$ -L-ラムノピラノシド残基を加水分解する酵素であり、ここでのラムノシダーゼ活性は次の方法により求めた値とす  
15      る。

#### (ラムノシダーゼ活性測定方法)

自動化学分析装置 (東芝社製、TBA-30R) を用い、所定量の組成物を含む試料溶液 30  $\mu\text{L}$  をパラニトロフェニル (pNP) - $\alpha$ -ラムノシド (シグマ社製) を 2 mM となるように酢酸緩  
20      衝液 (pH 5.5) に溶解せしめたもの 200  $\mu\text{L}$  と混合し、40℃、サイクルタイム 22.5 秒で 9.75 分間反応させた後、炭酸ナトリウム 250  $\mu\text{L}$  を加え 412 nm の吸光度を測定する。試料溶液由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を用いて同様に測定する。この条件下で吸光度を 1 上昇させる酵素量を 1 単位 (AU) とする。

25      本発明の他の局面は上記の風味改善用組成物を利用した葡萄を原料とする酒の

製造方法に関し、上記の風味改善用組成物を作用させる酵素処理工程（以下、略称して「酵素処理工程」ともいう）を含んでなることを特徴とする。

本発明が適用される葡萄を原料とする酒の種類は特に限定されない。本発明における葡萄を原料とする酒には、ワインをはじめ、その蒸留酒であるコニャックなどのブランデー、ベルモットやポートワイン、リキュールなどの混成酒が含まれる。また、ワインには赤ワイン、白ワイン、ロゼワイン、スパークリングワインといった各種のワインが含まれる。さらに、後に希釈されたり他の食品に添加されたりして使用される濃縮状態のワインも含む。

10 本発明の酵素処理工程を、葡萄を原料とする酒の通常の製造工程の一部と同時に行うことが好ましい。別途酵素処理工程を設ける必要がなく、製造効率の向上が図られるからである。

例えば、赤ワインの一般的な製造工程は葡萄の除梗破碎、発酵、圧搾、オリ引き、熟成の各工程からなり、これらのいずれか又は複数の工程を、本発明の組成物を添加した状態で行うことができる。また、白ワインの一般的な製造工程は葡萄の除梗破碎、圧搾、発酵、オリ引き、熟成の各工程からなり、これらのいずれか又は複数の工程を、本発明の組成物を添加した状態で行うことができる。

以上のように葡萄を原料とする酒の製造工程の一部を、本発明の組成物を添加した状態で行うことにより、当該工程において本来の加工処理と当該組成物に含まれる酵素による酵素処理が同時に行われる。

ここで、ワイン（赤、白、ロゼを含む）の場合には酵素処理に供する工程として除梗破碎工程、圧搾工程、発酵工程、オリ引き工程、及び／又は熟成工程を選択することが好ましい。特に、加工温度が酵素処理に適していること、赤ワインの場合は果皮組織の一部が破碎されて酵素が作用しやすい状態であることなどの

理由から、発酵工程及び／又は熟成工程において本発明の組成物を添加して酵素処理を行うことが好ましい。

尚、上記のように通常の製造工程の一部を、本発明の組成物を添加した状態で  
5 行う場合には、当該工程の最初に当該組成物を添加する必要は必ずしもなく、当該工程中の適当な時期に当該組成物を添加しても良い。このようにすれば酵素の作用時間を調節でき、所望の風味改善を行うことが可能となる。尚、酵素処理を行う際には、酵素反応が良好に行われるように当該工程における加工温度を調整することができる。

10

一方、本発明における酵素処理工程を独立した工程として行うこともできる。他の工程と同時に酵素処理工程を行う場合には、酵素の添加が当該他の工程の加工処理効率などに与える影響を場合によって考慮する必要があるが、酵素処理工程を独立させることにより、このような影響を考慮する必要がなくなる。このこ  
15 とは、酵素処理工程において好ましい温度条件、pH 条件などを自由に設定できることを意味し、効率的な酵素処理を可能とする。

酵素処理工程を独立した工程として行う場合には、例えば上記の一般的な製造工程（例えば、赤ワインでは葡萄の除梗破碎、発酵、圧搾、オリ引き、熟成の各  
20 工程、白ワインでは葡萄の除梗破碎、圧搾、発酵、オリ引き、熟成の各工程）のいずれか又は複数の工程の前あるいは後に酵素処理工程を行うことができる。

酵素処理工程の後の適当な時期にペントナイト等を用いたろ過、熱処理などを行い、添加した組成物の除去を行うことが好ましい。かかる除去工程は葡萄を原料とする酒の通常の製造過程において行われるオリ引き工程で代用することがで  
25

きる。

本発明の組成物の添加は、液体状又は固体状（粉体状）の組成物を葡萄破碎液（抽出液、果汁）に直接添加することにより行うことができる。

5

酵素処理工程における本発明の組成物の使用量は、使用する葡萄の種類、必要とされる風味改善の程度、酵素処理工程における葡萄破碎液の状態などを考慮して適宜定めることができる。例えば、発酵工程前又は発酵工程において酵素を添加して酵素処理を行う場合には、葡萄 160 g を用いて得られた葡萄破碎液 100 ml  
10 に対してジグリコシダーゼが 0.0026 単位～26000 単位添加される量とする。好ましくはジグリコシダーゼが 0.026 単位～2600 単位、更に好ましくは 0.26 単位～260 単位添加される量とする。

尚、本発明の組成物の使用量が少な過ぎる場合には、目的とする風味改善効果が十分に得られない恐れがあり、逆に多すぎる場合には製造コストが上昇すること  
15 とはもとより、組成物中に存在する夾雑物の作用および味によって却って風味を損なう恐れがあるため好ましいものとはいえない。

本発明の組成物を添加して作用させる場合の温度は、通常 4℃～40℃、好ましくは 10℃～30℃、より好ましくは 15℃～25℃である。作用させる温度  
20 が前記の通常の範囲より低い場合には組成物中の酵素の作用が十分発揮されず風味改善効果が得られにくく、前記の通常の範囲より高い場合には、組成物中の酵素の失活が生じ易くなると共に葡萄破碎液中の成分が熱変性を受けて変性し、これに起因して風味が劣化する可能性がある。

一方、本発明の組成物を作用させる pH は、通常 1.5～6.5、好ましくは  
25 2.0～5.5、より好ましくは 2.5～4.5 である。作用させる pH が前記

の通常の範囲より低い場合或いは高い場合には組成物中の酵素の作用が十分発揮されず風味改善効果が得られにくく、また葡萄破碎液中の成分が変性を受けやすくなり、これに起因して風味が劣化する可能性がある。

以下に、本発明を、実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれらの実施  
5 例のみに限定されるものではない。

#### 〔実施例 1〕 微生物由来の風味改善用組成物の調製

(1-1) ペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*)  
IAM7153 株の培養

10 2.0%の脱脂大豆、3.0%ブドウ糖、0.5%リン酸二水素カリウム、0.4%硫酸アンモニウム、  
0.3%乾燥酵母を含む生育培地 (pH5.6) を 121°C で 20 分間殺菌した。殺菌した培地 100 mL  
に対して生産菌を 1 エーゼ接種し、27°C、140 min<sup>-1</sup> の振とう速度で前培養を行った。5 日  
後、1.0%サンファイバーR、2.0%リン酸二水素カリウム、1.0%硫酸アンモニウム、3.13%ミ  
15 ースト PIG を含む pH4.9 の本培地 20 L を 30 L 容のジャーファーメンターにて、150 min<sup>-1</sup>  
で攪拌しながら 121°C で 20 分間殺菌した。この本培養培地に前記の前培養の培地を 1.5%(v  
/v) で接種し、攪拌数 250 min<sup>-1</sup>、通気量 0.75 vvm (15 L/min)、内圧 0.5 Kg/cm<sup>2</sup> (4  
8 kPa)、27±1°C で 8 日間培養した。

#### (1-2) 培養液からの風味改善用組成物の調製

20 培養ブロスに濾過助材としてゼムライトスーパー56M とファインフローA をそれぞれ全液  
量の 2% を添加し、珪藻土ろ過を行った。限外濾過膜 UF AIP-2020 (MW6,000) で 20 倍濃縮  
を行うとともに、pH4.7 の 20 mM 酢酸緩衝液で置換した。これを無菌ろ過し、凍結乾燥した  
ものを風味改善用組成物とした。

25 〔実施例 2〕 ワインに対する風味改善効果の評価

(2-1) 白ワイン用葡萄(北海道産、ケルナー種)果汁(葡萄破碎液)の調製

ドイツ系葡萄品種であるケルナー種の果汁の調製を以下の手順で行った。まず、ケルナー種の葡萄果実（冷凍品）12 kg を解凍した後、破碎・除梗処理を行った。この処理の際に、最終的に得られる果汁中の含量が 100 mg/L となるように（搾汁率を 65% として計算）、780 mg のピロ亜硫酸カリウムを添加した。次に、スキン

5     コンタクト法で果皮成分の抽出を行った（室温、2 時間）。その後ナイロンメッシュ布を用いて搾汁した。その結果、7.5 L の果汁が得られた。この果汁の比重換算糖度測定を行ったところ、比重：1.0847、果汁転化糖分：20.18 であった。

10 (2-2) アルコール発酵、酵素処理、及び成分等の分析

アルコール発酵は、まず酵母(UvafermBC、商品名、ノボザイムズ社製)に 0.1g/ml となるように 40℃の温水に懸濁し、5分間放置して活性化した後、このうちの 15ml を果汁に添加して行った。

酵素反応は、以下の表 1 に示す条件で実施例 1 の風味改善用組成物を添加して  
15 行った。比較例として、風味改善用組成物の代わりに、白ワインの香気増強を目的として市販されている  $\beta$ -グルコシダーゼ剤を用いて酵素反応を行った。

【表 1】

酵素剤	添加時期	添加量(単位)
無添加	-	0
風味改善用組成物	発酵開始時	7.8
	発酵開始時	39
	発酵開始時	195
	発酵開始時	975
	発酵開始時	3900
	発酵開始時	7800
	発酵後	7.8
$\beta$ -グルコシダーゼ剤	発酵開始時	65.6
	発酵開始時	656
	発酵開始時	6560
	発酵後	65.6

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。 $\beta$ -グルコシダーゼ活性は以下の方法により測定した。

( $\beta$ -グルコシダーゼ活性測定法)

自動化学分析装置(東芝社製、TBA-30R)を用い、所定量の組成物を含む試料溶液 30  $\mu$ L をパラニトロフェニル (pNP) - $\beta$ -グルコシド(シグマ社製)を 2 mM となるように酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解せしめたもの 200  $\mu$ L と混合し、40°C、サイクルタイム 22.5 秒で 9.75 分間反応させた後、炭酸ナトリウム 250  $\mu$ L を加え 412 nm の吸光度を測定する。試料溶液由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を用いて同様に測定する。この条件下で吸光度を 1 上昇させる酵素量を 1 単位 (AU) とする。

15 酵素剤の添加及び酵素反応を次の二つの方法で行った。即ち、①酵素剤の添加

- を酵母の添加と同時に行い、アルコール発酵と酵素反応とを並行して行わせる方法、及び②果汁に酵母を添加してアルコール発酵させた後、酵素剤を添加して酵素反応を行わせる方法、である。具体的には、前者の方法（上記①の方法）では、果汁に酵母と酵素剤を添加した後、20℃、7日間静置することでアルコール発酵及び酵素反応を行った。そして、添加後2日目と4日目、及び発酵終了時（7日目）にサンプリングを実施した。各サンプルを3000rpmで10分間遠心分離して得られた上清を各種分析に供した。分析項目は、pH、アルコール分、滴定酸度（N/10水酸化ナトリウム）、官能評価、及びGC/MSによるテルペン系香気成分の定量とした。
- 10 一方後者の方法（上記②の方法）では、果汁に酵母のみを添加して20℃で7日間、静置発酵させた後、酵素を添加して20℃で1ヶ月間さらに静置した（酵素反応）。酵素反応終了後にサンプリングした。各サンプルを3000rpmで10分間遠心分離して得られた上清を各種分析に供した。こちらについては、分析項目を一般成分（pH、アルコール分、滴定酸度（N/10水酸化ナトリウム））の分析、官能評価、GC/MSによるテルペン系香気成分の定量とした。
- 15

①の方法（アルコール発酵と酵素反応を並行して行う方法）によって得られたサンプルの一般成分（pH、アルコール分、滴定酸度（N/10水酸化ナトリウム））の分析結果を表2に示す。

20 【表2】



酵素剤	添加量 (単位)	滴定酸度			pH			アルコール		
		2日目	4日目	7日目	2日目	4日目	7日目	2日目	4日目	7日目
無添加	—	10.1	9.4	9.5	3.9	3.9	4.0	2.5	9.9	12.7
風味改善用組成物	7.8	9.5	9.4	9.5	3.8	3.8	3.9	2.2	9.8	13.3
	39	9.7	9.3	9.5	3.8	3.8	3.9	2.2	10.3	13.4
	195	9.4	9.2	9.4	3.8	3.8	4.0	2.5	10.5	13.4
	975	9.6	9.1	9.7	3.8	3.8	4.0	2.9	11.3	13.3
	3900	9.8	9.7	9.8	3.8	3.8	4.1	3.2	12.5	13.3
	7800	9.7	9.3	10.1	3.9	3.9	4.2	3.6	12.5	12.4
β-グルコシダーゼ剤	65.6	9.2	9.1	9.2	3.9	3.9	4.0	1.4	9.5	13.2
	656	8.7	8.8	9.3	3.9	3.9	4.0	1.4	9.8	13.2
	6560	9.9	9.2	10.5	3.9	3.9	4.0	1.9	11.7	13.5

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では、添加される組成物に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、β-グルコシダーゼ剤を添加する群では、添加されるβ-グルコシダーゼ剤に含まれるβ-グルコシダーゼ活性で表している。

風味改善用組成物の添加によって、これらの成分に大きな変化は認められなかった。また、これらの成分の他、ポリフェノール含量、比重、色調についても調べたところ、いずれも大きな変化は認められなかった（データ示さず）。以上の結果より、風味改善用組成物の添加によって一般成分はほとんど影響を受けず、これらの成分を基準とする品質を変えることなく酵素処理を行えることが示された。

次に、①の方法によって得られた発酵終了時（7日目）のサンプルを用いて官能評価を行った結果を表3に示す。8人のパネラーを用いて、マスカット系及びドイツ系品種のワインにおいて重要視されるテルペン香の強さを5段階（評点5：強い、評点4：やや強い、評点3：普通、評点2：やや弱い、評点1：弱い）で評価し、各パネラーの評点と、パネラー全員の合計点、及び平均点を出した。

【表3】

酵素剤	添加量 (単位)	パネラー								合計	平均点
		A	B	C	D	E	F	G	H		
無添加	—	3	2	4	2	2	3	3	3	22	2.8
風味改善用組成物	7.8	4	4	3	3	4	4	5	2	29	3.6
	39	3	3	2	3	5	4	4	3	27	3.4
	195	2	4	4	4	3	3	2	1	23	2.9
$\beta$ -グルコシダーゼ剤	65.6	3	2	3	4	3	4	4	3	26	3.3
	656	2	1	3	3	2	4	4	3	22	2.8
	6560	2	3	2	3	1	3	2	3	19	2.4

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

表 3 に示されるように、風味改善用組成物の添加によってテルペン香が明らかに強くなることが示された。

続いて、表 4 に GC/MS によるテルペン系香気成分の分析結果を示す。

10 【表 4】

酵素剤	添加量 (単位)	リナロール			$\alpha$ -テルピネオール			シトロネロール		
		2日目	4日目	7日目	2日目	4日目	7日目	2日目	4日目	7日目
無添加	0	41.6	41.0	48.6	N.D.	N.D.	14.7	N.D.	8.2	34.8
風味改善用 組成物	7.8	43.6	44.4	82.8	3.2	N.D.	9.0	N.D.	N.D.	12.9
	39	42.2	67.4	80.7	N.D.	N.D.	5.9	N.D.	N.D.	14.0
	195	45.3	67.9	146.2	N.D.	N.D.	12.8	N.D.	N.D.	13.9
	975	56.5	145.2	233.3	N.D.	12.7	30.3	N.D.	N.D.	13.6
	3900	111.7	266.3	297.6	14.7	33.8	60.3	N.D.	N.D.	18.0
	7800	170.0	333.1	299.3	27.2	59.4	88.6	N.D.	21.1	34.8
$\beta$ -グルコシダー ゼ剤	65.6	39.4	51.6	50.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	656	43.2	53.2	56.7	N.D.	N.D.	4.8	N.D.	N.D.	13.9
	6560	46.4	62.9	118.0	N.D.	N.D.	6.8	N.D.	N.D.	17.7
ドイツワイン	-	-	-	6.1	-	-	41.9	-	-	N.D.

ネロール			ゲラニオール			合計		
2日目	4日目	7日目	2日目	4日目	7日目	2日目	4日目	7日目
N.D.	N.D.	19.5	N.D.	N.D.	43.9	41.6	49.2	161.5
N.D.	N.D.	46.4	N.D.	N.D.	N.D.	46.8	44.4	151.1
N.D.	N.D.	32.8	N.D.	N.D.	N.D.	42.2	67.4	133.4
10.4	42.1	37.6	13.5	N.D.	N.D.	69.2	110.0	210.5
11.7	57.2	24.4	14.0	N.D.	N.D.	82.2	215.1	301.5
N.D.	31.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	126.4	332.0	375.9
N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	197.3	413.5	422.7
N.D.	19.5	10.7	12.6	N.D.	N.D.	52.0	71.2	61.6
N.D.	23.0	21.4	N.D.	N.D.	16.1	43.2	76.2	113.0
N.D.	60.5	26.0	36.6	N.D.	14.4	83.0	123.4	182.9
-	-	N.D.	-	-	N.D.	-	-	47.9

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

表4に示されるように、ネロール、ゲラニオールについては風味改善用組成物の添加量の増加に連動していないが（小スケールの試験であるが故に、発酵中ないしは酵素反応中に酸化などの影響を受けたためであると予測される）、それ以外の香氣成分では風味改善用組成物の添加量の増加に伴って各含量が増加している。また、各香氣成分の含量の変動は、概ね添加開始からの日数にも連動しているこ

とが認められる。一方、添加量で比較した場合には、風味改善用組成物の方が市販の $\beta$ -グルコシダーゼ剤よりも香気成分の増強に効果的であることがわかる。尚、表4の最下段には市販のドイツワインを用いて各香気成分を測定した結果を示した。

5

次に、アルコール発酵後に酵素反応を行った場合（上記②の方法）における、官能評価試験及びGC/MS分析の結果を表5及び表6にそれぞれ示す。官能評価試験では、風味改善用組成物を添加して得られたサンプルと市販の $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加して得られたサンプルのうち、テルペン香を強く感じる方をパネラーが選択する方法を採用した。

10

【表5】

酵素剤	添加量(単位)	香りの強い方	コメント
風味改善用組成物	7.8	6人	フレッシュな香り。軽い花の香り。さわやか。まろやかな香り。ブドウらしい。やや刺激的。スッキリしたタイプ。
$\beta$ -グルコシダーゼ剤	65.6	1人	落ち着いた香り。グリーンな香りがやや強い。甘酸っぱい香り。薬品の様な感じ。重厚なタイプ

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

15

20

表5に示されるように、市販の $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加した場合に比較して、風味改善用組成物を添加した場合の方が明らかにテルペン香が強くなることが確認された。また、両者において香りの感じが異なることから、既存の $\beta$ -グルコシダーゼ剤添加による香気成分増強効果と異なる新規な香気増強効果を得ることが可能と考えられる。

【表6】

酵素剤	添加量(単位)	リナロール	$\alpha$ -テルピネオール	シトロネロール	ネロール	ゲラニオール	合計
無添加	0	72.5	13.9	9.4	3.6	N.D.	99.4
風味改善用組成物	7.8	132.7	24.7	N.D.	37.6	N.D.	195.0
$\beta$ -グルコシダーゼ剤	65.6	94.3	15.0	N.D.	N.D.	N.D.	109.3

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

表6に示したように、風味改善用組成物を添加した場合の方が各香気成分の含量が多く、上記の官能評価を裏付ける結果となった。また、風味改善用組成物を添加した場合にはネロールが検出されており、市販の $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加した場合とは質的に異なる風味の改善が行われていることが分る。

### 【実施例3】 風味改善用組成物の添加量の検討、及び他の酵素剤との比較

風味改善用組成物添加量と香気成分増強効果との関係を更に検討すべく、酵素添加量を絞って再度白ワインの仕込み試験を行った。また、この試験においては風味改善用組成物を添加して酵素処理を行ったサンプルと市販の $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加して酵素処理を行ったサンプルとを比較した。表7に、使用した風味改善用組成物及び $\beta$ -グルコシダーゼ剤におけるジグリコシダーゼ活性(DGL)、ラムノシダーゼ活性(Rhm)、及び $\beta$ -グルコシダーゼ活性(Glc)を示す。

【表7】

酵素剤	酵素活性(単位/g)		
	ジグリコシダーゼ活性(*)	ラムノシダーゼ活性(**)	グルコシダーゼ活性(***)
風味改善用組成物	2600	38532	1920
$\beta$ -グルコシダーゼ剤	2.2	15.6	2187

(\*)：pNP- $\beta$ -primeverosideを基質として測定

(\*\*): pNP- $\alpha$ -rhamnoside を基質として測定

(\*\*\*): pNP- $\beta$ -glucopyranoside を基質として測定

- まず、実施例 2 と同様の方法で、ケルナー果実 6 kg を出発原料としてケルナー果汁を調製した。得られた果汁の比重は 1.0794、果汁転化糖分は 18.83 であった。

- 果汁を各酵素添加用に分取した後、それぞれに酵母 (UvafermBC、商品名、ノボザイムズ社製) を添加し、続いて各酵素剤の添加を行った。酵母は 0.1g/ml となるように水を加え、40℃で 5 分間放置して活性化した後、15ml を果汁に添加した。また、各酵素剤の添加は所定の添加量となるように水に溶解し、水溶液の状態で添加した。各酵素剤の添加量、及び仕込量を次の表 8 に示す。

【表 8】

酵素剤	添加量 (単位/仕込み)	仕込量 (mL)
無添加	0	300
風味改善用組成物	3.9	300
	7.8	300
	23.4	300
	2.0	200
$\beta$ -グルコシダーゼ剤		

- 尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される  $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる  $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

酵母及び酵素剤を添加した後の果汁を、20℃で静置してアルコール発酵及び各酵素反応を行った。発酵終了時 (6 日目) に 20ml ずつをサンプリングした。各サ

サンプルを 3000rpm で 10 分間遠心分離して得られる上清を用いて一般成分(滴定酸度 (N/10 水酸化ナトリウム溶液)、pH、アルコール分)及び香気成分の分析、並びに官能評価を行った。

- 香気成分量の分析には TDS 加熱脱着システム / Agilent GC/MSD システム
- 5 (GERSTEL 社製) を使用した。カラム : HP-INNO Wax Polyethylene Glycol (30.0m × 250  $\mu$ m × 0.25  $\mu$ m) のカラムを用い、移動相をヘリウム、流速を 1.0ml/min、気化温度を 40°C、5 分 → (5°C/min) → 240°C、15 分、スプリット比を 1 : 50 とした。また、サンプル 10mL に NaCl 2.0g、内部標準 (4-ノナノール 5  $\mu$ g) を添加し、Twister (撹拌子 ; GERSTEL 社) を入れ 30 分撹拌した後、分析を開始した。
- 10 尚、測定した香気成分 (モノテルペンアルコール類) と定量に使用した m/z 値は次の通りである。

- 内部標準 4-ノナノール (m/z = 101)
- リナノール (m/z = 93)
- $\alpha$ -テルピネオール (m/z = 121)
- 15 シトロネロール (m/z = 123)
- ネロール (m/z = 93)
- ゲラニオール (m/z = 123)

また、定量用のファクターは、0.5%リンゴ酸溶液に ~1000ppb のモノテルペンアルコール類を添加し、試料と同様に分析して求めた。

20

以下の表 9 に、発酵終了時の各サンプルを用いて行った滴定酸度 (N/10 水酸化ナトリウム溶液)、pH、アルコール分の分析結果を示す。

【表 9】

酵素剤	添加量 (単位)	添加時期	滴定酸度 N/10NaOH(mL)	pH	アルコール (w/w%)
無添加	0		9.2	3.61	11.35
風味改善用組成物	3.9	発酵と同時	9	3.58	11.35
	7.8	発酵と同時	9.1	3.59	11.35
	23.4	発酵と同時	9.2	3.6	11.35
$\beta$ -グルコシダーゼ剤	2.0	発酵と同時	8.7	3.59	11.25

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

風味改善用組成物を添加した場合には各成分値に大きな変化はなかった。また、添加量の違いによって各成分値に大きな変動が生ずることもなかった。以上の結果より、測定対象とした一般成分にほとんど影響を与えることなく風味改善用組成物による酵素処理を行えること、即ちこれらの一般成分を基準とする品質を変えることなく風味改善用組成物による酵素処理を行えることが確認された。

続いて、香気成分量の分析結果を表10に示す。

【表10】



酵素剤	添加量 (単位)	添加時期	リナロール		$\alpha$ -テルピネオール		シトロネロール	
			0日	6日	0日	6日	0日	6日
無添加	0		30.95	35.75	N.D.	N.D.	N.D.	22.58
風味改善用組成物	3.9	発酵と同時	-	40.87	-	4.5	-	15.99
	7.8	発酵と同時	-	41.47	-	4	-	16.32
	23.4	発酵と同時	-	52.43	-	4.72	-	19.79
$\beta$ -グルコシダーゼ剤	2.0	発酵と同時	-	35.46	-	3.09	-	14.28

ネロール		ゲラニオール		計	
0日	6日	0日	6日	0日	6日
6.25	N.D.	9.71	20.53	46.91	78.86
-	N.D.	-	21.62	-	82.98
-	N.D.	-	20.95	-	82.74
-	14.32	-	29.74	-	121
-	7.11	-	N.D.	-	59.94

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

表 10 に示されるように、風味改善用組成物を添加した場合には、概ね添加量の増加に連動して各香気成分の含量が増加しているのが認められる。

- 10 発酵終了後のサンプルを用いた官能評価試験は 10 人のパネラーを用いて行った。口中香を含むテルペン系の香りの強さを 5 段階（評点 5：強い、評点 4：やや強い、評点 3：普通、評点 2：やや弱い、評点 1：弱い）で評価し、各パネラーの評点と、パネラー全員の合計点、及び平均点を出した。官能評価試験の結果を表 11 に示す。

酵素剤	添加量 (単位)	添加時期	パネラー										計	平均点
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		
無添加	0		2	3	2	3	3	2	3	3	4	2	27	2.7
風味改善用組成物	3.9	発酵と同時	2	2	4	2	2	1	3	1	3	3	23	2.3
	7.8	発酵と同時	4	2	4	5	4	2	4	1	2	2	30	3.0
	23.4	発酵と同時	5	4	3	4	4	3	4	1	4	3	35	3.5
$\beta$ -グルコシダーゼ剤	2.0	発酵と同時	3	3	2	3	2	1	4	3	4	1	26	2.6

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

風味改善用組成物を添加した群では、コントロール（酵素無添加）に比較して、テルペン系の香りがほぼ同等又は強くなるとの評価が得られた。添加量が 3.9 単位ではコントロールよりも評価が低く十分な香気成分増強効果が得られない。一方、添加量が 7.8 単位の場合にはコントロールよりも明らかに評価が高く、十分な香気成分増強効果が得られることがわかる。さらに添加量の多い 39 単位では、更なる香気成分の増強が行われていることが確認できる。以上から、少なくともその添加量が 7.8 単位あれば、風味改善用組成物の添加によって香気成分の増強効果が得られることが示唆される。

#### 〔実施例 4〕 赤ワインに対する風味改善効果の評価

赤ワインに対する風味改善効果を以下の手順で評価した。まず、市販の赤ワイン（フランス産ボルドーシュペリユール（国分株式会社輸入））を用意し、以下の表 1 2 に示す条件で実施例 1 の風味改善用組成物を添加し、20℃で 9 日間作用させた。その後、各サンプルを 3000rpm で 10 分間遠心分離して得られた上清を用いて香気成分の分析を行った。尚、比較例として白ワインの香気増強を目的とし

て市販されている $\beta$ -グルコシダーゼ剤を用いた。

【表 1 2】

No.	赤ワイン 30 mL に対する酵素添加量		
1	風味改善用組成物	30mg+水 0.1mL 添加	78 単位
2	風味改善用組成物	30mg/mL を 0.1mL 添加	7.8 単位
3	風味改善用組成物	3mg/mL を 0.1mL 添加	0.78 単位
5	$\beta$ -グルコシダーゼ剤	30mg/mL を 0.1mL 添加	65.3 単位
7	無添加	水 0.1mL 添加	0

5

香気成分量の分析にはヘッドスペース (HP7694 Headspace sampler, Alilent technologies 社製)-GC/MSD (HP5973GC/HP6890MSD, Agilent technologies 社製) システムを使用した。カラムは、HP-WAX (60 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m)を使用し、移動層をヘリウム、流速を 1.0 mL/min とした。分析サンプルをバイアルに入れ、  
 10 85℃で 20 分間加熱後、気体をサンプリングし、スプリット比 25:1 で GC/MS に注入した。初期のオープンで 35℃で 5 分間保持し、5℃/min の速度で 100℃まで昇温後、更に 10℃/min の速度で 230℃まで昇温し、10 分間保持させた。

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダー  
 15 ゼ剤を添加する群では添加される  $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる  $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

分析結果を表 1 3 に示す。

【表 1 3】

Peak No.	無添加	添加量 (ジグリコシダーゼ単位)			添加量 (β-グルコシダーゼ単位)		化合物名
		78	7.8	0.78	65.3		
1	645813 1.0	1032273 1.6	736483 1.1	522471 0.8	769260 1.2		Ethyl propionate
2	2297101 1.0	14388032 6.3	12024229 5.2	4407696 1.9	2393265 1.0		Ethyl caprylate
3	494374 1.0	1066060 2.2	702584 1.4	539129 1.1	505635 1.0		Benzaldehyde
4	N.D. -	213325 ∞	300307 ∞	N.D. -	137005 ∞		Butane-4-oide
5	N.D. -	187661 ∞	83903 ∞	N.D. -	N.D. -		Methyl salicylate
6	118608 1.0	296007 2.5	195854 1.7	60338 0.5	87206 0.7		Benzylalcohol

尚、酵素剤の添加量は、風味改善用組成物を添加する群では添加される組成物中に含まれるジグリコシダーゼ活性量で表している。同様に、 $\beta$ -グルコシダーゼ剤を添加する群では添加される $\beta$ -グルコシダーゼ剤中に含まれる $\beta$ -グルコシダーゼ活性で表している。

尚、表中の無添加は風味改善用組成物を添加しない状態で同様に処理（20℃で9日間放置）を行って得られたサンプルの分析結果を表す。表13では、この無添加（コントロール）に対して変化した成分のみを示した。各ピークにおいて上段にはピーク面積、下段には無添加に対する面積比がそれぞれ示される。風味改善用組成物を作用させることにより、前駆体として配糖体の形で存在することが知られている香気成分の Benzaldehyde、Methyl salicylate、及び Benzyl alcohol の含有量が顕著に増加していることがわかる。また、これら以外にも Ethyl propionate、Ethyl caprylate といったエステルなども増加していることがわかる。一方、比較例である $\beta$ -グルコシダーゼ剤を作用させた場合にもいくつかの成分の増加が認められるが、その増加の程度は低い。尚、風味改善用組成物を作用させた場合には香りが花様の甘いものとなり、香気の改善が行われていることが確認された（データ示さず）。

以上の各実施例の結果から、ワインの製造工程において本発明の風味改善用組成物を作用させることがワインの香気成分改善に有効な手段であることが確認された。また、本発明の風味改善用組成物はワインの原料となる葡萄果汁中の成分に作用して香気成分を引き出すことから、上記で例として用いた白ワイン及び赤

5   ワインのみならず、ロゼワインなどの他のワインは勿論のことその他の葡萄を原料とする酒の製造に対してもその香気成分を増強させる手段として本発明の風味改善用組成物が有効であるといえる。

10   以下、次の事項を開示する。

(11)   ラムノシダーゼ活性が、乾燥重量換算で 0.0001 単位/mg 以上である、請求項 1～4 のいずれかに記載の風味改善用組成物。

(21)   ジグリコシダーゼを作用させる酵素処理工程、を含んでなる葡萄を原料とする酒の製造方法。

15   (22)   前記酵素処理工程が、葡萄を原料とする酒の製造工程の一部にジグリコシダーゼを添加して行うことからなる、(21) に記載の製造方法。

(23)   前記製造工程の一部が、圧搾工程、発酵工程、オリ引き工程、及び熟成工程の中から選択される一又は二以上の工程である、(22) に記載の製造方法。

(24)   発酵工程及び／又は熟成工程においてジグリコシダーゼを添加する、

20   ことを特徴とする葡萄を原料とする酒の製造方法。

(25)   前記ジグリコシダーゼが微生物由来である、(21)～(24) のいずれかに記載の製造方法。

(26)   前記ジグリコシダーゼがペニシリウム・マルチカラー (Penicillium multicolor) 由来である (21)～(24) のいずれかに

25   記載の製造方法。

(27) 前記ジグリコシダーゼがアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 由来である(21)～(24)のいずれかに記載の製造方法。

(28) 前記葡萄を原料とする酒がワインである、(21)～(27)のいずれ  
5 かに記載の葡萄を原料とする酒の製造方法。

(29) (21)～(28)のいずれかに記載の製造方法により製造された、  
葡萄を原料とする酒。

(30) ジグリコシダーゼの作用により風味が改善された、葡萄を原料とする  
酒。

10 (31) ジグリコシダーゼの作用により風味が改善されたワイン。

(41) ジグリコシダーゼ及びラムノシダーゼを作用させる酵素処理工程、を  
含んでなる葡萄を原料とする酒の製造方法。

(42) 前記酵素処理工程が、葡萄を原料とする酒の製造工程の一部にジグリ  
15 コシダーゼ及びラムノシダーゼを添加して行うことからなる、(41)に記載の製  
造方法。

(43) 前記製造工程の一部が、圧搾工程、発酵工程、オリ引き工程、及び熟  
成工程の中から選択される一又は二以上の工程である、(42)に記載の製造方法。

(44) 発酵工程及び／又は熟成工程においてジグリコシダーゼ及びラムノシ  
20 ダーゼを添加する、ことを特徴とする葡萄を原料とする酒の製造方法。

(45) 前記ジグリコシダーゼが微生物由来である、(41)～(44)のいづ  
れかに記載の製造方法。

(46) 前記ジグリコシダーゼ及びラムノシダーゼがペニシリウム・マルチカ  
ラー (*Penicillium multicolor*) 由来である(41)～(4  
25 4)のいずれかに記載の製造方法。

(47) 前記ジグリコシダーゼ及びラムノシダーゼがアスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 由来である(41)～(44)のいずれかに記載の製造方法。

(48) 前記葡萄を原料とする酒がワインである、(41)～(47)のいずれ  
5 かに記載の葡萄を原料とする酒の製造方法。

(49) (41)～(48)のいずれかに記載の製造方法により製造された、  
葡萄を原料とする酒。

(50) ジグリコシダーゼ及びラムノシダーゼの作用により風味が改善された、  
葡萄を原料とする酒。

10 (51) ジグリコシダーゼ及びラムノシダーゼの作用により風味が改善された  
ワイン。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、香気成分が増強されることによって風味が改善された葡萄を  
15 原料とする酒を提供できる。特に、従来使用されている市販のβ-グルコシダー  
ゼ剤で風味の改善を行った場合に比較して、より風味のよい葡萄を原料とする酒  
を提供できる。

また、本発明の組成物の使用量によって香気成分の増強の程度を調整でき、様々な  
香気バランスを有する葡萄を原料とする酒を提供することが可能となる。

20 さらに、本発明の組成物は発酵工程前、或いは発酵工程中においても添加、作用  
させることができる。即ち、添加時期の制約が少なく、製造工程上有利である。  
発酵工程前、或は発酵工程中に添加して使用すれば、酵母の除去と同時に本発明  
の組成物の除去を行うこともでき、製造工程の簡素化、製造コストの減少などの  
効果も奏される。

## 請求の範囲

1. アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、タラロマイセス (*Talaromyces*) 属、モルチエレラ (*Mortierella*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、又はアクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属に属し、かつジグリコシダーゼを生産可能な菌株の培養物を含む、葡萄を原料とする酒の風味改善用組成物。

10

2. 前記菌株が、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、又はペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) に属する、請求の範囲第1項に記載の風味改善用組成物。

15

3. 前記菌株が、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IFO4407、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IAM 2020、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) IAM2046、又はペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) IAM7153である、請求の範囲第1項に記載の風味改善用組成物。

20

4. ペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) IAM7153が生産する菌体外酵素を含む風味改善用組成物。

25



5. ジグリコシダーゼ活性が、乾燥重量換算で 0.0001 単位／mg 以上である、請求の範囲第 1 項に記載の風味改善用組成物。
6. 請求の範囲第 1 項に記載の風味改善用組成物を作用させる酵素処理工程、を含んでなる、葡萄を原料とする酒の製造方法。
7. 前記酵素処理工程が、葡萄を原料とする酒の製造工程の一部に前記風味改善用組成物を添加して行うことからなる、請求の範囲第 6 項に記載の製造方法。
- 10 8. 前記製造工程の一部が、除梗破碎工程、圧搾工程、発酵工程、オリ引き工程、及び熟成工程の中から選択される一又は二以上の工程である、請求の範囲第 7 項に記載の製造方法。
- 15 9. 発酵工程及び／又は熟成工程において請求の範囲第 1 項に記載の風味改善用組成物を添加する、ことを特徴とする葡萄を原料とする酒の製造方法。
10. 前記葡萄を原料とする酒がワインである、請求の範囲第 6 項に記載の葡萄を原料とする酒の製造方法。
- 20 11. 請求の範囲第 6 項に記載の製造方法により製造された、葡萄を原料とする酒。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04770

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.C1<sup>7</sup> C12G1/022, C12N9/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.C1<sup>7</sup> C12G1/022, C12N9/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 307071 A2 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM), 15 March, 1989 (15.03.89), Full text & IL 82980 A1 & AU 8818309 A1 & DK 8803520 A & JP 2-186985 A2 & AT 153062 E & ES 2104554 T3	1-11
A	Shoseyov, Oded; Bravdo, Ben Ami; Siegel, Dan; Goldman, Alexander; Cohen, Shlomo; Shoseyov, Lisa; Ikan, Raphael, 'Immobilized endo-beta.-glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice', Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, Vol.38, No.6, pages 1387-90	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 23 June, 2003 (23.06.03)	Date of mailing of the international search report 08 July, 2003 (08.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. <sup>7</sup> C12G1/022, C12N9/24

B. 調査を行った分野  
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl. <sup>7</sup> C12G1/022, C12N9/24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 307071 A2 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM) 1989. 03. 15, 全文 & IL 82980 A1 & AU 8818309 A1 & DK 8803520 A JP 2-186985 A2 & AT 153062 E & ES 2104554 T3	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 06. 03

国際調査報告の発送日

08.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

4C

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3402

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Shoseyov, Oded; Bravdo, Ben Ami; Siegel, Dan; Goldman, Alexander; Cohen, Shlomo; Shoseyov, Lisa; Ikan, Raphael, 'Immobilized endo-.beta.-glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice', Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, Vol.38, NO.6, pages 1387-90	1 - 1 1